

①③ DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION

1^{re} PUBLICATION

②② Date de dépôt..... 4 août 1971, à 15 h 5 mn.
④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 13 du 31-3-1972.

⑤① Classification internationale (Int. Cl.) .. G 01 n 33/00//C 12 k 1/00.

⑦① Déposant : Société dite : NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION,
résidant aux États-Unis d'Amérique.

Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Jean Maisonnier, Ingénieur-Conseil, 28, rue Servient, 69-Lyon (3).

⑤④ Procédé et dispositif pour les analyses d'urine.

⑦② Invention de : Emmet William Chappelle et Grace Lee Picciolo.

③③ ③② ③① Priorité conventionnelle : *Demande de brevet déposée aux États-Unis d'Amérique le 4 août 1970, n. 60.950 aux noms de Emmett William Chappelle et Grace Lee Picciolo.*

La présente invention concerne une méthode de détection et de comptage des bactéries présentes dans des échantillons d'urine, afin de déterminer l'étendue d'affections des voies urinaires, et plus spécialement une nouvelle méthode de comptage de bactéries qui est basée sur la présence et la détermination du triphosphate d'adénosine (ATP) qui est un nucléotide présent dans toutes les matières vivantes connues.

Une technique rapide et courante pour la détection quantitative et le comptage de bactéries est souvent d'une importance vitale. Les techniques classiques, qui offrent l'avantage d'une identification positive des bactéries, sont ordinairement lentes et exigent des moyens assez complexes. La technique décrite ici pour la détection et le comptage des bactéries présentes dans un échantillon d'urine présente un haut degré de sensibilité, de rapidité, d'exactitude, et de reproductibilité. Elle exploite la spécificité et la sensibilité élevée d'une réaction enzymatique bioluminescente dans l'analyse d'un échantillon d'urine, en y associant une méthode nouvelle pour éliminer de l'échantillon les composés gênants afin de rendre la réaction enzymatique bioluminescente quantitative pour le triphosphate d'adénosine bactérien.

L'ATP est universellement présent dans toute matière vivante, ce qui fait de ce composé un excellent indicateur de la présence de diverses formes de vie, par exemple des bactéries. Une des méthodes les plus sensibles pour la détermination quantitative de l'ATP est une détermination enzymatique bioluminescente. Dans cette réaction, la bioluminescence se produit par suite de la réaction de l'ATP avec un enzyme luciférase, actuellement tiré des lucioles, et un substrat de luciférine plus des ions métalliques divalents tels que magnésium ou manganèse.

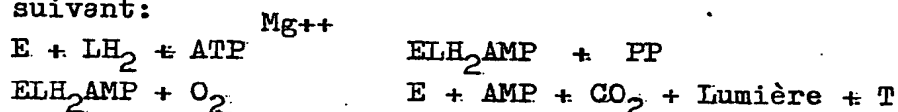
Il a été antérieurement démontré avec des cultures pures d'un certain nombre d'espèces de bactéries que la concentration de l'ATP bactérien pouvait être étroitement rattaché au comptage des bactéries. Cela est étudié en détail par E.W. Chappelle et G.V. Levin dans un article intitulé "Emploi de la réaction bioluminescente de la luciole pour une détection et un comptage rapide de bactéries" présenté dans "Biochemical Medicine", Vol. 2, pages 41 à 52 (Juin 1968). En mesurant la teneur en ATP d'un certain nombre d'espèces sur la base de l'unité-cellule, la teneur moyenne en ATP d'une cellule de bactérie a été établie d'une manière

générale comme étant $3 \times 10^{-10} \mu\text{g}$ (allant de $0,28 \times 10^{-10} \mu\text{g}$ à $8,9 \times 10^{-10} \mu\text{g}$).

Pour pouvoir utiliser la détermination de l'ATP pour la détection de bactéries dans de l'urine, il fallait mettre au point une méthode pour l'élimination de l'ATP non-bactérien urinaire avant la détection de l'ATP bactérien. Les sources essentielles de l'ATP non-bactérien urinaire sont l'ATP soluble libre et l'ATP dans les globules rouges et blancs du sang. L'élimination de l'ATP non-bactérien est effectuée en rompant d'abord, par exemple avec un détersif non-ionic, les globules sanguins rouges et blancs de l'échantillon d'urine, ce qui en libère l'ATP à l'état soluble libre. Ensuite, par l'addition d'un enzyme hydrolysant l'ATP (c'est à dire une ATPase), la totalité de l'ATP non-bactérien soluble libre est hydrolysée. L'enzyme hydrolyseur d'ATP est ensuite soit dénaturé (c'est à dire détruit) par chauffage, soit rendu inactif par un moyen chimique.

Après avoir éliminé de l'échantillon d'urine l'ATP non-bactérien, on libère l'ATP bactérien en rompant les bactéries avec un acide. Ensuite, l'acide est neutralisé et le pH et la concentration ionique de l'échantillon d'urine sont ajustés au moyen d'un tampon pour obtenir une activité optimum de luciférase. L'échantillon d'urine, à ce stade du traitement, sera maintenant dénommé échantillon d'urine traité. On le combine avec un mélange luciférase-luciférine et, si des bactéries sont présentes, la lumière de la réaction bioluminescente est détectée et enregistrée par des appareils appropriés.

La méthode de détermination de l'ATP présent dans l'échantillon d'urine traité est basée sur un système enzymatique bioluminescent, le même que celui qu'on rencontre chez les lucioles. Le mécanisme de réaction couramment admis pour ce système enzymatique est le suivant:



E = luciférase de luciole

LH₂ = luciférine réduite

ATP = triphosphate d'adénosine

AMP = monophosphate d'adénosine

PP = pyrophosphate

T = thiazolinone

Mg⁺⁺ = ion de magnesium

CO₂ = anhydride carbonique

O₂ = oxygène

Si tous les constituants de la réaction ci-dessus sont mainte-
nus à une concentration dépassant l'ATP, l'émission de lumière
5 est directement proportionnelle à la quantité d'ATP introduite.
Cela permet de relier directement l'intensité de l'émission de
lumière à la concentration d'ATP, quand l'échantillon d'urine
traité est combiné avec le mélange luciférase-luciférine, par
l'emploi d'une courbe de référence préparée comme décrit en dé-
10 tail plus loin. En outre, si on veut connaître le nombre de bac-
téries équivalent à la concentration d'ATP dans l'échantillon d'
urine, on peut l'obtenir en divisant simplement la concentration
d'ATP, basée sur la mesure de l'émission de lumière, par 3×10^{-10}
µg, teneur moyenne en ATP d'une cellule bactérienne.

15 Les méthodes actuellement employées pour déterminer et comp-
ter des bactéries dans l'urine sont: 1) des méthodes par culture
qui comprennent la méthode par touches et la méthode des plaques
solidifiées, et 2) des méthodes directes qui comprennent le
comptage au microscope et une autre méthode basée sur l'aptitu-
20 de d'organismes à réduire des nitrates en nitrites.

La méthode par touches se pratique en déposant par touches
une petite quantité d'urine sur une plaque de gélose solide ren-
fermant des produits nutritifs. La méthode des plaques solidi-
fiées est plus précise mais prend beaucoup plus de temps du fait
25 qu'elle exige une série de dilutions de l'échantillon d'urine à
analyser, et ensuite le mélange de portions précises de ces di-
lutions avec un produit nutritif bactérien liquide préchauffé,
contenant de la gélose. Le mélange ainsi obtenu est ensuite ver-
sé dans un vase de Pétri et se solidifie sous forme de plaque
30 par abandon. Dans les deux méthodes qu'on vient de décrire, une
période d'incubation de 1 à 4 jours est nécessaire, après quoi
les plaques sont examinées quant au développement de colonies de
bactéries, le nombre de colonies étant une mesure du comptage
des bactéries. Au mieux ces méthodes sont toutes deux semiquan-
35 titatives, et ne permettent pas la détection d'organismes non-
cultivables qui pourraient offrir de l'intérêt.

Bien que la méthode par touches et la méthode des plaques so-
lidifiées pour la détermination du comptage des bactéries don-
nent toutes deux des résultats qui semblent correspondre avec d'
40 autres symptômes d'infections des voies urinaires, elles présen-

- tent des inconvénients. La source de ceux-ci réside dans l'exigence fondamentale d'une croissance des bactéries, celle-ci offrant certaines difficultés. L'une d'elles est la période d'incubation qui, comme indiqué, peut varier de 1 à 4 jours environ.
- 5 Un tel délai dans le diagnostic d'une infection des voies urinaires peut, dans certains cas, avoir une importance critique. On peut mettre en doute la valeur des méthodes par culture, si l'on considère la nature délicate et exclusive de beaucoup d'espèces de bactéries quant aux conditions nécessaires spécifiques de nutrition et d'environnement. Par conséquent, quand on considère
- 10 que la plupart des laboratoires médicaux n'utilisent que deux types de milieux nutritifs dans la culture de spécimens d'urine, la possibilité de ne pas détecter certains organismes viables devient effective. En fait, des expériences ont indiqué qu'un
- 15 pourcentage important de bactéries urinaires sont des anaérobies ne pouvant vivre que dans des conditions spécifiques. Naturellement, il existe aussi d'autres raisons qui empêchent également la croissance des bactéries, par exemple la mort ou la léthargie des cellules et la présence d'agents bactériostatiques.
- 20 La méthode de comptage direct au microscope exige le dépôt de portions précises de l'échantillon d'urine sur une lame étalonnée. On regarde ensuite cette lame à travers un microscope et on compte les bactéries présentes. Les inconvénients de cette méthode sont le temps et les efforts dépensés par un technicien qualifié et, en outre, le fait qu'on ne peut pas l'utiliser pour l'analyse d'échantillons troubles. La méthode directe par microscope est en général plus précise que les techniques de culture du fait qu'elle fait intervenir le comptage direct des bactéries au lieu de dépendre de l'aptitude des bactéries à croître et à former des colonies.
- 25
- 30 La présente invention fournit une méthode de détection et de comptage des bactéries dans un échantillon d'urine grâce à laquelle on peut rompre les diverses cellules non-bactériennes contenant de l'ATP, sans affecter les cellules bactériennes qui contiennent aussi de l'ATP; hydrolyser l'ATP non bactérien avec un agent hydrolysant approprié, puis traiter l'échantillon pour détruire ou rendre inactif cet agent hydrolysant; rompre les cellules bactériennes avec un acide pour libérer l'ATP bactérien qui s'y trouve, puis neutraliser l'acide et ajuster le pH et la concentration ionique de l'échantillon à un niveau qui favorisera la
- 35
- 40

réaction de l'ATP avec un mélange luciférase-luciférine; combiner l'échantillon ainsi traité avec le mélange luciférase-luciférine, et mesurer avec un matériel approprié connu des techniciens la quantité de lumière émise par ce mélange.

- 5 Dans un autre aspect de l'invention, l'ATP non-bactérien présent par suite de la présence de globules sanguins rouges ou blancs dans l'échantillon est éliminé sans affecter les bactéries qui contiennent de l'ATP qui sera finalement quantitativement déterminé. Une fois l'ATP non-bactérien indésirable éliminé, on
- 10 rompt les bactéries pour en libérer l'ATP qu'elles contiennent et permettre ainsi la détermination quantitative de ce dernier.

- En bref, il est fourni une méthode de détection et de comptage des bactéries dans l'urine qui consiste à: a) ajouter à un échantillon d'urine un composé capable de libérer à l'état soluble libre l'ATP présent dans la matière non-bactérienne contenue
- 15 dans cet échantillon, sans libérer l'ATP que contiennent les bactéries présentes dans l'échantillon; b) ajouter un composé capable d'hydrolyser tout l'ATP soluble libre non-bactérien; c) traiter l'échantillon pour détruire ou rendre inactif l'agent d'hydrolyse; d) acidifier l'échantillon pour rompre les bactéries et
- 20 libérer l'ATP bactérien qu'elles contiennent; e) neutraliser l'acide et ajuster le pH et la concentration ionique à un niveau qui favorise la réaction bioluminescente de l'ATP bactérien avec un mélange luciférase-luciférine; f) combiner l'échantillon d'urine traité ci-dessus avec un mélange luciférase-luciférine qui
- 25 contient un cation métallique divalent, par exemple magnésium ou manganèse; et g) détecter et enregistrer la quantité de lumière émise par cette réaction, en utilisant un matériel photométrique de sensibilité convenable.

- 30 Pour utiliser la détermination d'ATP pour la détection de bactéries dans un système physiologique aqueux, par exemple l'urine, il est nécessaire de mettre au point un moyen d'éliminer de ce système l'ATP non-bactérien. Les sources essentielles d'ATP non-bactérien dans un échantillon d'urine, par exemple, sont l'ATP
- 35 soluble libre et l'ATP contenu dans les globules sanguins rouges et blancs qui peuvent également être présents avec d'autres contaminants dans l'échantillon d'urine. L'élimination de l'ATP non-bactérien est réalisée en rompant les globules rouges et blancs pour en libérer l'ATP à l'état soluble libre, et en ajoutant ensuite un enzyme hydrolysant l'ATP (c'est à dire une ATPase) pour
- 40

détruire la totalité de l'ATP soluble libre dans l'échantillon d'urine. Après inactivation ou dénaturation (c'est à dire destruction) de l'enzyme d'hydrolyse de l'ATP, on libère l'ATP contenu dans les bactéries en rompant celles-ci, et on le fait réagir avec le mélange luciférase-luciférine, ce qui a pour résultat une émission de lumière d'une intensité proportionnelle à la concentration d'ATP et par conséquent proportionnelle au dénombrement des bactéries dans l'échantillon d'urine.

On peut employer n'importe quel moyen pour rompre les cellules non-bactériennes pour en libérer l'ATP, à condition que ce moyen soit suffisamment sélectif pour rompre uniquement les cellules non-bactériennes, et soit non-toxique ou bien apte à être rendu non-toxique. C'est à dire que rien ne doit gêner une réaction ultérieure quelconque, en particulier la réaction bioluminescente de l'ATP bactérien avec le mélange luciférase-luciférine. Une manière de rompre les cellules non-bactériennes est l'emploi d'un moyen qui réduise la tension superficielle des cellules non-bactériennes.

Certains composés tensioactifs qui abaissent la tension superficielle de solutions aqueuses, en particulier ceux classés comme détersifs cathioniques, anioniques, et non-ioniques, sont en général suffisamment sélectifs pour rompre les cellules non-bactériennes pour permettre la libération de leur ATP sans affecter les bactéries contenues dans l'échantillon.

Bien qu'on puisse utiliser des détersifs cathioniques et anioniques dans le procédé de la présente invention, des détersifs non-ioniques tels que l'octyl-phénoxy-polyéthoxyéthanol sont économiques, faciles à obtenir, donnent toute satisfaction, et sont donc préférés.

Des exemples de quelques autres composés tensioactifs convenant pour le procédé sont les saponines triterpénoïdes, les saponines stéroïdes, les sulfosuccinates, par exemple les dioctyl sodium sulfosuccinates, divers glycosides, et certains dérivés polyoxyéthyléniques d'esters partiels d'acides gras d'anhydrides de sorbitol.

La rupture des cellules non-bactériennes est en général effectuée à la température ambiante et à la pression ambiante, en laissant reposer l'échantillon d'urine pendant 1 minute à une heure environ, et de préférence pendant 5 à 20 minutes, et mieux encore pendant 10 minutes environ. Le temps pendant lequel on

laisse reposer l'échantillon d'urine, par exemple quand on y a ajouté un détersif non-ionique comme l'octyl-phénoxy-polyéthoxy-éthanol, dépend en partie de la température, du fait que la vitesse de rupture augmentera de façon appréciable pour chaque degré d'augmentation de la température. Toutefois, lors d'un long repos ou bien à des températures élevées, le détersif non-ionique pourrait commencer à attaquer les bactéries, en réduisant de ce fait la précision et l'exactitude de la méthode.

Quand on emploie comme agent de rupture l'octyl-phénoxy-polyéthoxyéthanol, détersif non-ionique, il donne les meilleurs résultats quand il est à une concentration allant d'environ 0,05 à 5 pour cent en volume et est ajouté à l'échantillon d'urine en quantité équivalant à approximativement 5 à 15% du volume de cet échantillon.

Une fois que les cellules non-bactériennes contenant de l'ATP ont été sélectivement rompues par l'octyl-phénoxy-polyéthoxyéthanol et que l'ATP a été libéré de ces cellules non-bactériennes à l'état soluble libre, on ajoute à l'échantillon d'urine un composé capable d'hydrolyser la totalité de l'ATP soluble libre contenu dans l'échantillon d'urine. Le moyen non toxique le plus spécifique d'hydrolyser l'ATP est l'emploi des enzymes d'hydrolyse d'ATP communément dénommés ATPases. On peut employer n'importe quelle ATPase, par exemple l'apyrase de pomme de terre, l'apyrase d'insectes, l'ATPase de muscle et l'ATPase de foie. L'apyrase de pomme de terre, du fait qu'elle est plus complètement caractérisée, facile à purifier, facile à obtenir, et donne d'excellents résultats, est l'agent hydrolysant préféré pour emploi dans la mise en pratique de la présente invention.

Après l'addition de l'ATPase, on laisse reposer l'échantillon d'urine à la température et pression ambiantes pendant un temps suffisant pour permettre à l'hydrolyse de se poursuivre à bonne fin. En général, on laisse reposer l'échantillon de 1 à 25 minutes environ, et de préférence d'environ 5 à 15 minutes.

Une fois l'ATP non-bactérien libéré et hydrolysé avec l'ATPase, l'enzyme hydrolysant doit être inactivé ou détruit (dénaturation de l'enzyme) pour l'empêcher de gêner l'analyse de l'ATP libéré ultérieurement par les bactéries. Cela peut être fait par des moyens physiques ou avec des agents chimiques. Des agents chimiques spécifiques sont les acides, bases, sels de métaux lourds, les solvants organiques, et les composés classés comme

inhibiteurs d'enzymes. Les moyens physiques comprennent le chauffage et l'irradiation par ondes courtes. Le chauffage de l'échantillon d'urine pendant un court laps de temps, c'est à dire 1 à 15 minutes environ, et de préférence 5 à 12 minutes environ, à une température allant de 60°C à 100°C, est efficace pour dénaturer l'enzyme d'hydrolyse. De même, l'addition d'acide perchlorique à l'échantillon d'urine est efficace en inactivant l'enzyme d'hydrolyse.

Toute une gamme de composés et de techniques peut être employée pour réaliser l'inactivation ou la dénaturation de l'enzyme d'hydrolyse, la seule condition nécessaire étant la destruction effective de l'activité de ce dernier sans affecter de façon appréciable les cellules bactériennes ou la réaction bioluminescente employée pour déterminer l'ATP bactérien. Tout composé utilisé qui est toxique pour la réaction luciférase-ATP doit finalement être éliminé ou neutralisé.

La dénaturation de l'enzyme d'hydrolyse est en général réalisée à une température élevée, de préférence 95°C, et à la pression ambiante: si toutefois il devait être plus commode, ou nécessaire, de l'effectuer à des pressions élevées, il n'y a pas de raison apparente de ne pas le faire.

Bien que la description ait été présentée jusqu'ici avec addition du détersif non-ionique à l'échantillon d'urine avant l'addition de l'enzyme d'hydrolyse de l'ATP, ces additions se faisant successivement, il est bien entendu que ces deux ingrédients peuvent être ajoutés simultanément, soit séparément soit sous forme de mélange.

Une fois que l'ATP non-bactérien pouvant gêner a été effectivement éliminé de l'échantillon d'urine, et que l'enzyme d'hydrolyse a été inactivé ou dénaturé, on refroidit l'échantillon à la température ambiante. Ensuite, l'ATP bactérien est libéré par rupture des parois des cellules des bactéries présentes, et l'ATP ainsi libéré est mis à réagir avec la combinaison luciférase-luciférine comme précédemment indiqué.

Beaucoup de composés et de techniques différents peuvent être utilisés pour rompre les parois des cellules des bactéries et libérer l'ATP bactérien. Ils comprennent des acides organiques comme l'acide acétique et l'acide formique, des acides inorganiques comme l'acide perchlorique, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, et l'acide nitrique. En outre, des

ultra-sonores et certains solvants organiques comme le butanol sont efficaces pour libérer l'ATP bactérien. Ici encore, les conditions fondamentales exigées de ce réactif sont qu'il rompe les parois des bactéries pour libérer l'ATP sans réagir avec cet ATP et sans gêner les réactions ultérieures, et en particulier la réaction bioluminescente de l'ATP avec la combinaison luciférase-luciferine.

L'acide perchlorique convient particulièrement bien pour cette opération; et, après l'addition d'une petite quantité d'acide perchlorique à une concentration relativement faible, on laisse reposer l'échantillon pendant environ 10 secondes à 15 minutes, et de préférence pendant 1 à 7 minutes environ. La réaction est rapide et n'exige pas beaucoup de temps pour libérer l'ATP bactérien. Si on laisse l'échantillon reposer trop longtemps après l'addition de l'acide perchlorique, l'ATP qui est libéré des bactéries peut être défavorablement affecté par l'acide. Si on emploie trop d'acide, la précision de l'analyse finale en sera affectée, car l'anion acide a un effet défavorable sur la réaction bioluminescente.

Bien que la vitesse de la réaction soit augmentée pour chaque augmentation supplémentaire de la température, la rupture des bactéries est en général optimum à la température ambiante, et il n'y a pas de gain appréciable à des températures élevées, qui pourraient d'ailleurs très bien être nuisibles en ce sens que l'ATP pourrait être détruit. Par ailleurs, alors qu'il est très commode de rompre les bactéries à la température ambiante, rien n'empêche de le faire à des températures aussi basses que 5°C.

Dans un échantillon d'urine de 1cmc, dans lequel on emploie l'acide perchlorique pour libérer l'ATP bactérien, une quantité allant de 0,05 cmc à 1 cmc, d'une solution à 0,05 à 5 N d'acide perchlorique peut être employée. Une quantité insuffisante d'acide ne rompra pas les parois des bactéries, tandis qu'un excès d'acide peut avoir un effet défavorable sur l'ATP après la libération de celui-ci.

La neutralisation de l'acide peut être effectuée avec une base organique ou inorganique. Des exemples de ces bases comprennent les hydrates métalliques alcalins et hydrates métalliques alcalino-terreux, ainsi que ceux des composés organiques capables d'accepter des ions d'hydrogène sans affecter défavorablement la réaction bioluminescente qui nous intéresse ici. La condition néces-

saire pour la base est, naturellement, qu'elle soit capable de neutraliser l'acide. En outre, on préférera une base dont le cation réagisse avec un anion gênant d'un acide de la phase précédente pour former un précipité insoluble, en éliminant ainsi de l'échantillon des ions nuisibles et en évitant ainsi qu'ils gênent plus tard l'analyse. Cela est préférable, comme l'est tout autre arrangement qui éliminera les ions pouvant gêner la réaction bioluminescente. Cela est également pratique d'un point de vue économique, du fait qu'on évite une phase supplémentaire dans l'analyse, à savoir l'élimination absolument nécessaire de ces ions avant la réaction bioluminescente.

La quantité de base employée peut aller de 0,05 cmc à 1 cmc d'une solution de 0,05 à 5 N d'hydrate de potassium. Une quantité insuffisante de base ne neutralisera pas effectivement l'acide, et un excès de base peut être nuisible pour l'ATP libéré des bactéries.

Le pH et la concentration ionique finaux de l'échantillon sont ensuite ajustés avec un tampon qui peut y être ajouté soit pratiquement en même temps que la base, soit n'importe quand ensuite. Ce tampon sert à maintenir assez exactement le pH de l'échantillon d'urine à environ 7,4, ce qui est le pH optimum pour une activité maximum de la combinaison luciférase-luciférine. Si l'activité de l'ion d'hydrogène (pH) devait devenir plus faible ou plus grande de façon appréciable, la précision finale de l'analyse en souffrirait par suite de l'activité diminuée de la combinaison luciférase-luciférine. En outre, en présence d'un tampon, les volumes d'acide et de base nécessaires dans les phases précédentes n'ont pas besoin d'être aussi critiques car le tampon compensera toute différence mineure. On peut utiliser n'importe quel tampon qui maintient le pH de l'échantillon d'urine dans l'intervalle 6,8 à 7,8 environ, ou mieux 7,2 à 7,6, et mieux encore à 7,4 environ, sans entraver la réaction principale. La quantité de tampon ajoutée est comprise en général entre 0,05 cmc et 1 cmc environ, à une concentration d'environ 2 à 2,5 M. Les tampons qui remplissent ces conditions et qui peuvent être utilisés dans le procédé de la présente invention comprennent le tampon TES (N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthanesulfonique acide), les tampons de phosphates, les tampons d'arsénites, les tampons tria comme par exemple tris (hydroxyméthyl) aminométhane, les tampons d'arsines, le tampon de glycylglycine, et le tampon d'acide N-2-

hydroxyéthylpiperazine-N-2-éthanesulfonique.

L'échantillon d'urine ainsi traité est alors combiné avec la combinaison luciférase-luciférine contenant des ions divalents de magnésium ou de manganèse, et la lumière émise pendant la réaction bioluminescente est mesurée avec des instruments appropriés.

Un instrument connu pouvant rendre automatique le procédé décrit ci-dessus, y compris la mesure de la lumière émise dans la réaction bioluminescente, comprend une table tournante munie de réceptacles espacés pour recevoir continuellement des flacons d'échantillons d'urine amenés automatiquement et faire ensuite passer ces flacons sous un certain nombre de distributeurs qui distribuent successivement une quantité prédéterminée des divers ingrédients utilisés dans le procédé à ces flacons au fur et à mesure que ceux-ci passent sous chaque distributeur. A cette table tournante sont également associés des moyens de chauffage, des moyens de refroidissement, et des moyens de photodétection, tous positionnés avec précision, de même que les distributeurs, de manière à réaliser pour chaque opération la succession chronologique convenable comme indiqué plus haut. Il faut souligner que la zone dans laquelle la réaction à bioluminescence a lieu et où le moyen de photodétection est positionné pour fournir une mesure de la lumière émise est étanche à la lumière, si bien que le moyen de photodétection n'enregistrera que la lumière provenant de la réaction bioluminescente. En outre, si on veut inactiver l'agent hydrolysant par des moyens chimiques, les moyens de chauffage et une partie des moyens de refroidissement peuvent être rendus inopérants.

L'invention est illustrée plus en détail par les exemples qui suivent, dans lesquels, sauf indication contraire, toutes les parties et tous les pourcentages sont en poids.

EXEMPLES I à XVII

Introduction

La technique utilisée dans l'analyse d'échantillons donnée dans le Tableau I ci-après impliquait l'obtention d'un échantillon d'urine et son traitement pour éliminer tant l'ATP à l'état soluble libre que celui présent dans tous globules sanguins rouges ou blancs présents dans l'échantillon. Cela a été réalisé en rompant sélectivement les globules rouges et blancs avec Triton X-100 (marque de fabrique déposée de la Rohm and Haas Corpora-

tion pour une qualité d'octyl-phénoxy-polyéthoxyéthanol) et en ajoutant de l'apyrase de pomme de terre qui est un enzyme hydrolysant l'ATP. Au bout d'un court moment on a chauffé l'échantillon d'urine à 95°C environ pour dénaturer l'apyrase de pomme de terre.

5. Puis on a acidifié l'échantillon avec de l'acide perchlorique afin de rompre les bactéries, et on a ensuite neutralisé avec une solution d'hydrate de potassium avant d'ajuster le pH de l'échantillon à à peu près 7,4 avec un tampon de TES (acide N-tris(hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthanesulfonique). Une partie de cet
- 10 échantillon d'urine traité a ensuite été combinée, comme expliqué plus en détail ci-après, avec la combinaison luciférase-luciférine contenant des ions divalents de magnésium ou de manganèse, et on a mesuré la lumière émise.

Traitement des échantillons d'urine

- 15 a) Un échantillon d'urine de 1 cmc a été mélangé avec 0,1cmc d'une solution de Triton X-100 à 1% en volume et à une solution (0,1cmc) d'apyrase de pomme de terre (décrite plus loin), et a été laissé à reposer à la température ambiante pendant 10 minutes.
- b) L'échantillon a ensuite été chauffé à 95°C environ pendant
- 20 10 minutes pour dénaturer l'apyrase de pomme de terre. Après ce chauffage on a laissé refroidir l'échantillon à la température ambiante et on y a ensuite ajouté 0,1cmc d'acide perchlorique 1,0 N, puis on a laissé l'échantillon reposer pendant cinq minutes.
- 25 c) La solution d'acide perchlorique a ensuite été neutralisée par l'addition de 0,1cmc d'une solution d'hydrate de potassium 1,0 N.
- d) Le pH final de l'échantillon a été amené à 7,4 par l'addition de 0,1cmc de tampon de TES 2,0 M (acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthanesulfonique), et on obtient ainsi l'é-
- 30 chantillon d'urine traité.

Préparation du mélange luciférase-luciférine

- De la luciférase de luciole partiellement purifiée a été préparée à partir de lanternes séchées de lucioles de la manière suivante. Un gramme d'une poudre acétonique préparée à partir de ces lanternes a été mélangé avec 10 cmc de tampon de TES 0,05 M froid et agité pendant 30 minutes. Après centrifugation de ce mélange à 13.000 X g pendant 15 minutes, la solution surnageante a été
- 35 placée sur une colonne de Sephadex G-200 (marque de fabrique déposée pour des perles de dextrane qui séparent des composés sur
- 40

la base du poids moléculaire) équilibrée avec un tampon de TES 0,05 M à un pH de 7,4, et éluée avec le même tampon. Les fractions tirées de cette colonne ont été testées quant à l'activité de luciférase en retirant deux portions de 0,2cmc auxquelles on a ajouté 0,1cmc du tampon de TES contenant de la luciférine synthétique (0,1 mg/cmc) et du sulfate de magnésium (0,01M). L'activité de la luciférase a été mesurée sur la base de l'émission de lumière lors de l'addition de 10^{-2} µg d'ATP au mélange. Les plus actives fractions tirées de la colonne, sur la base de l'intensité d'émission de lumière, ont été choisies, groupées, et mélangées avec une solution luciférine-magnésium (1 partie de luciférase pour 2 parties de luciférine (0,1 mg/cmc)-sulfate de magnésium (0,01M)), et ensuite lyophilisées en volumes de 10cmc. Les mélanges lyophilisés ont ensuite été stockés à -40°C et préparés pour emploi suivant les besoins par l'addition de 10cmc d'eau distillée.

Préparation de l'apyrase de pomme de terre

L'apyrase de pomme de terre a été préparée en pelant et en découpant en dés 500 grammes de pommes de terre blanches, en les ajoutant à 250cmc d'eau distillée froide, et en les homogénéisant dans un mélangeur pendant 5 minutes. Cette suspension a ensuite été filtrée à travers 2 couches de gaze, et le filtrat a été amené à 20% de saturation avec du sulfate d'ammonium, après quoi le pH a été ajusté à 4,0 environ. On a ensuite rajouté du sulfate d'ammonium pour atteindre 40% de saturation, et le mélange a été centrifugé à 13.000 X g pendant 15 minutes à la température du laboratoire. Le précipité a été écarté, et la solution surnageante a été portée à 75% de saturation avec du sulfate d'ammonium. Après 15 minutes de repos à la température du laboratoire, le mélange a été centrifugé comme ci-dessus. Le précipité a ensuite été dissous dans 50cmc d'eau distillée. L'extrait a été placé sur une colonne de Sephadex G-100 équilibrée avec du chlorure de calcium (0,01 M) dans un tampon de TES (0,05 M) à un pH de 7,4. Les fractions ainsi obtenues ont été testées quant à l'activité de l'apyrase en ajoutant des portions de 0,1cmc de chaque fraction à 1µg d'ATP contenu dans 1cmc de solution, et en laissant les portions reposer pendant 5 minutes, après quoi l'ATP restant a été mesuré en employant la détermination par luciférase de luciole. Les fractions actives étaient celles montrant une disparition complète de l'ATP. Ces fractions ont été groupées, lyophilisées,

et stockées à -40°C . Au moment où on va s'en servir, on les re-constitue par addition d'eau distillée.

Préparation de la Luciferine synthétique

La luciferine a été préparée suivant la méthode de White et autres présentée dans le "Journal of the American Chemical Society", Vol. 85, pages 337-343 (1963).

Mode opératoire

Au moyen d'une aiguille et d'une seringue, 0,1 cmc de l'échantillon d'urine traité, préparé de la manière décrite ci-dessus, a été injecté dans une cuvette contenant 0,3 cmc de la combinaison luciférase-luciferine contenant du magnésium. Cela a été fait pour chacun des 17 échantillons. Dans cette technique, chaque cuvette et un moyen de photodétection ont été disposés l'un par rapport à l'autre dans une chambre étanche à la lumière, de manière à ce que la lumière émise par la réaction de bioluminescence à l'intérieur de la cuvette puisse être détectée par le moyen de photodétection et mesurée ensuite par un moyen d'enregistrement relié électriquement au dit moyen de photodétection.

Une courbe type rapportant l'intensité de l'émission de lumière à la concentration d'ATP a été tracée comme suit:

Un certain nombre d'échantillons de 0,1 cmc contenant des quantités connues d'ATP sous forme de solution et couvrant l'intervalle allant de 10^{-1} μg . en diminuant jusqu'à 10^{-5} μg . ont été préparés. Chacun de ces échantillons d'ATP a été injecté individuellement dans une cuvette séparée de mélange fraîchement hydratée de luciférase-luciferine (confectionné de la manière décrite ci-dessus), et on a mesuré l'intensité de la lumière émise par chacune des réactions lumineuses ainsi obtenues. L'injection de l'ATP et la mesure de la lumière émise ont toutes deux été exécutées d'une manière identique à celle qui vient d'être décrite au sujet de l'échantillon d'urine. Pour chacun des échantillons de 0,1 cmc d'une quantité connue d'ATP on a obtenu une valeur particulière d'émission de lumière. Ces valeurs d'émission de lumière ont été portées par rapport à la quantité correspondante d'ATP pour former la courbe type.

En utilisant cette courbe type, les valeurs d'émission de lumière obtenues des 17 échantillons d'urine et mesurées par le moyen d'enregistrement ont été converties en concentrations d'ATP. Bien entendu, par suite des variations quotidiennes de l'activité de la luciférase, une courbe type doit être préparée

chaque jour pour obtenir les résultats les plus exacts.

Les comptages de bactéries énumérés dans la seconde colonne du Tableau I ci-après ont été calculés individuellement en divisant la concentration d'ATP de chacun des 17 échantillons d'urine par 3×10^{-10} $\mu\text{g.}$ qui est la teneur moyenne en ATP d'une cellule bactérienne.

Les comptages de bactéries obtenus par la méthode de l'ATP ont été comparés avec les comptages de bactéries obtenus sur le même échantillon en utilisant les techniques de la plaque solidifiée et du microscope. Les troisième et quatrième colonnes du Tableau I ci-après énumèrent ces dernières données.

Tableau I
Détermination du nombre de bactéries/cmc
par diverses méthodes

	<u>Echantillon</u>	<u>Méthode ATP</u>	<u>Plaque solidifiée</u>	<u>Microscope</u>
15	1	8×10^7	4×10^3	6×10^7
	2	8×10^7	9×10^3	7×10^8
	3	7×10^9	2×10^8	2×10^9
20	4	9×10^9	2×10^7	2×10^8
	5	4×10^8	3×10^5	8×10^7
	6	7×10^8	1×10^4	2×10^7
	7	4×10^7	1×10^7	2×10^8
	8	3×10^7	2×10^7	4×10^8
25	9	5×10^9	3×10^5	1×10^8
	10	3×10^7	—*	2×10^7
	11	8×10^7	—*	2×10^7
	12	6×10^7	2×10^7	3×10^8
	13	2×10^8	8×10^4	2×10^7
30	14	4×10^7	—	4×10^7
	15	5×10^8	3×10^7	7×10^8
	16	3×10^7	—*	2×10^7
	17	1×10^7	2×10^3	1×10^9

35 (* — indique qu'il n'y a pas eu croissance d'organismes)

Une comparaison des valeurs obtenues en employant la méthode ATP par rapport à la méthode de la plaque solidifiée indique que la méthode ATP est beaucoup plus exacte que la méthode de la plaque solidifiée qui a en outre le défaut de prendre plus de temps et d'être extrêmement laborieuse. On peut voir par un

40

examen du Tableau I que la méthode ATP est en correspondance plus étroite avec la méthode par microscope, alors que la méthode de la plaque solidifiée varie de jusqu'à 6 ordres de grandeur.

Des spécimens d'urine de 700 malades du John Hopkins Hospital (non présentés en Tableau) ont été testés pour les bactéries, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par la technique des plaques solidifiées. Dans tous les cas où le dénombrement des colonies dépassait 10.000 par cmc par la technique des plaques solidifiées, la réponse de l'ATP a été positive. En outre, dans la plupart des cas, le dénombrement des bactéries obtenu par la détermination par l'ATP était beaucoup plus élevé que celui obtenu par le dénombrement des colonies. En fait, dans un nombre important de cas où la détermination par l'ATP était positive, le dénombrement des colonies était négatif. Les explications possibles pour ces différences ont été décrites précédemment.

Bien que le procédé décrit jusqu'ici comprenne les phases de dénaturation par la chaleur de l'enzyme ATPase (solution d'apyrase de pomme de terre) hydrolysant l'ATP, puis de refroidissement de l'échantillon d'urine à la température ambiante, il faut souligner que ces opérations, ainsi que la phase de neutralisation de l'acide perchlorique par l'addition de la base (solution d'hydrate de potassium), peuvent être omises s'il ne s'écoule pas plus de dix secondes entre l'addition du tampon et l'addition du mélange luciferase-luciferine. Cette condition nécessaire peut être facilement remplie par un instrument automatisé. Dans ce cas-là, on ajoute l'acide (acide perchlorique) à l'échantillon d'urine après qu'il y a eu une période d'incubation d'environ 10 minutes du Triton X-100 et de la solution d'apyrase de pomme de terre que renferme déjà l'échantillon d'urine. L'acide perchlorique, dans ce cas-là, inactive l'enzyme hydrolysant et rompt en même temps toute bactérie présente. Ici encore, comme dans le procédé décrit précédemment, on laisse reposer pendant cinq minutes l'échantillon d'urine contenant l'acide perchlorique ajouté, puis on l'amène à un pH définitif de 7,4 par l'addition d'un tampon, dans le présent cas un tampon tris, et de préférence le tris(hydroxyméthyl)aminométhane, et on obtient ainsi l'échantillon d'urine traité qui est alors immédiatement mélangé avec la combinaison luciferase-luciferine contenant du magnésium.

Un certain nombre d'échantillons d'urine ont été testés en utilisant ce procédé de rechange. Les résultats obtenus sont donnés



dans le Tableau II en même temps que ceux obtenus par les méthodes classiques par microscope et par plaques solidifiées utilisées pour analyser les mêmes échantillons. On peut observer que les commentaires donnés ci-dessus pour le Tableau I s'appliquent aussi bien également au Tableau II.

Tableau II

Détermination du nombre de bactéries/cmc
par diverses méthodes

	<u>Echantillon</u>	<u>Autre méthode ATP</u>	<u>Plaques solidifiées</u>	<u>Microscope</u>
10	1	$2,8 \times 10^6$	1×10^5	$2,4 \times 10^4$
	2	$7,4 \times 10^5$	2×10^5	1×10^5
	3	$2,3 \times 10^6$	1×10^2	1×10^5
	4	$6,6 \times 10^8$	1×10^2	$2,3 \times 10^7$
	5	0	—*	0
15	6	6×10^5	1×10^2	2×10^4
	7	$6,6 \times 10^7$	4×10^7	6×10^7
	8	0	—*	0
	9	2×10^6	1×10^2	2×10^4

20 (* - indique qu'il n'y a pas eu de croissance d'organismes)

Traitement d'échantillons d'urine en utilisant les autres mises en oeuvre

a) Un échantillon d'urine de 1 cmc a été mélangé avec 0,1cmc d'une solution de Triton X-100 à 1% en volume et à 0,1cmc d'une solution d'apyrase de pomme de terre, et laissé à reposer à la température ambiante pendant 10 minutes.

b) Ensuite on a ajouté 0,1cmc d'acide perchlorique 1,0 N, et on a laissé reposer l'échantillon pendant cinq minutes. Dans ce cas-ci l'acide perchlorique a à la fois inactivé l'apyrase de pomme de terre (enzyme hydrolysant) et rompu les bactéries présentes pour en libérer l'ATP.

c) Puis le pH définitif de l'échantillon a été amené à 7,4 par addition de 0,1cmc de tris(hydroxyméthyl)aminométhane 2,5 M (un tampon tris), et on a ainsi obtenu l'échantillon d'urine traité.

d) Immédiatement on a injecté 0,1cmc de cet échantillon d'urine traité dans une cuvette contenant 0,3cmc de la combinaison luciférase-luciférine contenant du magnésium, cette cuvette étant positionnée à côté d'un moyen de photodétection dans une chambre étanche à la lumière, si bien que la lumière émise par la réaction bioluminescente pouvait être détectée par le moyen photodétecteur

et mesurée ensuite par un moyen d'enregistrement relié électriquement au moyen photodétecteur.

Les phases a à d ci-dessus ont été répétées pour chaque échantillon d'urine.

- 5 La méthode de la présente invention exposée ici a pour résultat une économie de temps considérable quand on la compare avec les méthodes connues jusqu'ici, du fait qu'elle n'exige aucune période d'incubation au cours de laquelle les bactéries se développent sur le substrat nutritif. En outre, cette analyse peut
10 être effectuée par des non-microbiologistes, et le personnel plus hautement qualifié peut être utilisé plus efficacement.

- Le test convient pour toutes bactéries, vivantes ou mortes; il n'est pas limité à celles capables de croissance aérobie; il est indépendant du type de produit nutritif exigé par les bactéries
15 pour croître convenablement; et en général il n'est pas affecté par la présence d'agents bactériostatiques qui inhibent la croissance.

- La méthode de l'invention non seulement convient pour emploi dans l'analyse d'échantillons d'urine pour déterminer des infections des voies urinaires par la mesure du niveau de bactéries,
20 mais encore elle est adaptable à la détermination de niveaux bactériens dans d'autres fluides corporels aqueux tels que lymphe, plasma, sang, liquide céphalo-rachidien, salive et mucosités, pour n'en citer que quelques uns. De plus, elle est particulièrement
25 applicable à la mesure de niveaux bactériens dans des fluides aqueux corporels contenant, outre les bactéries, à la fois de l'ATP soluble libre et des cellules non-bactériennes renfermant de l'ATP.

- Quand la méthode de l'invention est réalisée dans l'instrument automatisé mentionné plus haut, au lieu de démarrer avec 1cmc d'
30 échantillon d'urine dont, après l'avoir traité, on injecte 0,1cmc dans une cuvette contenant le mélange luciférase-luciferine, les flacons amenés à la table tournante contiennent chacun 0,1cmc d'échantillon d'urine, et chacun des ingrédients y est ajouté successivement dans une séquence chronologique particulière pour obtenir l'échantillon d'urine traité, auquel le mélange luciférase-luciferine est alors injecté. Ce par contraste avec la méthode
35 générale décrite, dans laquelle l'échantillon est injecté dans la cuvette contenant le mélange luciférase-luciferine.

REVENDICATIONS

1. Méthode de détection et de comptage de bactéries dans un échantillon d'urine, caractérisée en ce qu'elle comprend:
- a) la rupture des cellules non-bactériennes renfermant du
 - 5 triphosphate d'adénosine (ATP) présentes dans l'échantillon;
 - b) la destruction de l'ATP non-bactérien;
 - c) l'élimination de l'agent destructeur;
 - d) la rupture des cellules bactériennes, avec, de ce fait, libération d'ATP;
 - 10 e) ajustement de la concentration d'ions d'hydrogène de l'échantillon à un niveau favorable à une réaction bioluminescente de cet ATP avec un mélange luciférase-luciférine pour l'obtention d'un échantillon d'urine traité;
 - f) la combinaison de cet échantillon d'urine traité avec
 - 15 un mélange luciférase-luciférine, mélange qui contient en outre un cation métallique divalent choisi dans le groupe consistant essentiellement en magnésium et manganèse; et
 - g) l'enregistrement de la quantité de lumière émise par cette réaction.
- 20 2. Méthode selon la Revendication 1, caractérisée en ce que:
- a) la rupture des cellules non-bactériennes renfermant de l'ATP est effectuée par un composé qui réduit suffisamment la tension superficielle pour libérer l'ATP non-bactérien;
 - b) la destruction du dit ATP non-bactérien est accomplie
 - 25 avec un enzyme hydrolysant l'ATP;
 - c) l'élimination de cet enzyme hydrolysant est réalisée par dénaturation par la chaleur;
 - d) la rupture des cellules bactériennes est réalisée en acidifiant l'échantillon, ce qui inclut la phase additionnelle
 - 30 de:
 - e) la neutralisation de l'échantillon acidifié avec une base appropriée avant l'ajustement de la concentration d'ions d'hydrogène de l'échantillon à un niveau qui favorisera la réaction bioluminescente de l'ATP avec le mélange luciférase-lucifé-
 - 35 rine.
3. Méthode selon la Revendication 2, caractérisée en ce que l'échantillon est chauffé à une température dépassant 60°C, pendant un temps suffisant pour assurer la dénaturation de l'enzyme hydrolysant, et la concentration d'ions d'hydrogène de l'échan-
- 40 tillon neutralisé est ajustée avec une solution tampon pour for-

mer l'échantillon traité avec un pH de 6,8 à 7,8 environ.

4. Méthode selon la Revendication 2, encore caractérisée en ce que:

5 a) l'acidification est réalisée avec un acide choisi dans le groupe consistant essentiellement en acide perchlorique, acide chlorhydrique, acide sulfurique, acide acétique, acide phosphorique, et acide nitrique.

10 b) la neutralisation est effectuée avec une base choisie dans le groupe consistant essentiellement en hydrates métalliques alcalins et hydrates alcalino-terreux; et

c) l'ajustement de la concentration d'ions d'hydrogène est effectuée avec un tampon qui maintient un pH de 6,8 à 7,8 environ.

15 5. Méthode selon la Revendication 2, encore caractérisée en ce que:

a) les cellules non-bactériennes contenant de l'ATP sont rompues par un détersif non-ionique;

b) l'enzyme d'hydrolyse de l'ATP est une ATPase;

20 c) l'échantillon est chauffé de 60°C à 100°C pendant 1 à 15 minutes environ pour dénaturer l'ATPase;

d) l'échantillon est acidifié avec un acide inorganique pour rompre les cellules bactériennes;

e) l'échantillon est dénaturé avec une base métallique alcaline; et

25 f) la concentration d'ions d'hydrogène est ajustée en employant un tampon maintenant un pH allant de 7,0 à 7,6 environ.

6. Méthode selon la Revendication 5, caractérisée en ce que le détersif non-ionique est l'octyl-phénoxy-polyéthoxyméthane, l'ATPase est une solution d'apyrase de pomme de terre, l'acide inorganique est l'acide perchlorique, et la base métallique alcaline est l'hydrate de potassium.

7. Méthode selon la Revendication 6, caractérisée en ce que:

35 a) l'octyl-phénoxy-polyéthoxyéthanol est à une concentration d'environ 0,05 à 5,0 pour cent en volume et est ajouté à l'échantillon en quantité équivalente à peu près à 5 à 15 pour cent du volume du dit échantillon;

40 b) on ajoute une quantité de la solution d'apyrase de pomme de terre excédant celle requise pour l'hydrolyse de l'ATP non-bactérien, et on laisse l'échantillon reposer pendant un temps suffisant pour réaliser la rupture et l'hydrolyse;

c) l'échantillon est chauffé à 95°C pendant 5 à 15 minutes environ pour assurer la dénaturation de l'apyrase de pomme de terre;

d) l'échantillon est acidifié avec l'acide perchlorique à une concentration allant de 0,05 à 5,0 N, et on le laisse reposer pendant un temps allant d'environ 10 secondes à environ 15 minutes pour assurer la rupture des bactéries; et

e) on neutralise le dit acide perchlorique avec de l'hydrate de potassium à une concentration allant de 0,05 à 5,0 N de telle manière que les ions de potassium forment avec les ions de perchlorate un précipité insoluble; et

f) la concentration d'ions d'hydrogène est ajustée à l'aide d'un tampon non perturbateur qui maintient un pH allant d'environ 7,2 à environ 7,6.

8. Méthode selon la Revendication 7, caractérisée en ce que:

a) on ajoute 0,1 cmc d'une solution à 1 pour cent en volume d'octyl-phénoxy-polyéthoxyéthanol à 1,0 cmc de l'échantillon d'urine et on combine avec ce mélange 0,1 cmc d'une solution d'apyrase de pomme de terre, et on laisse reposer l'échantillon à la température ambiante pendant un temps allant d'environ 3 minutes à environ 20 minutes;

b) la solution d'acide perchlorique est neutralisée avec de l'hydrate de potassium, et la concentration d'ions d'hydrogène est ajustée en utilisant de l'acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthanesulfonique; et

c) on ajoute ensuite 0,1 cmc de l'échantillon d'urine traité à un mélange luciférase-luciférine contenant du magnésium.

9. Méthode selon la Revendication 7, caractérisée en ce que:

a) on ajoute 0,1 cmc d'une solution à 1 pour cent en volume d'octyl-phénoxy-polyéthoxyéthanol à 1,0 cmc de l'échantillon d'urine et on combine avec ce mélange 0,1 cmc d'une solution d'apyrase de pomme de terre, et on laisse reposer l'échantillon à la température ambiante pendant un temps allant d'environ 5 minutes à environ 20 minutes;

b) l'échantillon est chauffé à 95°C pendant un temps allant d'environ 8 minutes à environ 12 minutes afin d'assurer la dénaturation de l'apyrase de pomme de terre;

c) l'échantillon est acidifié avec environ 0,1 cmc d'acide perchlorique 1,0 N, et on le laisse reposer à la température ambiante pendant 5 minutes à peu près;

d) la solution d'acide perchlorique est neutralisée par l'ad-

dition d'une solution d'hydrate de potassium à 1,0 N;

e) la concentration d'ions d'hydrogène est ajustée pour maintenir le pH à 7,4 environ par l'addition de 0,1 cmc d'acide 2 M N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-2-aminoéthanesulfonique; et

5 f) on ajoute alors 0,1 cmc de l'échantillon d'urine traité à 0,3 cmc d'un mélange luciférase-luciférine contenant du magnésium.